

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-252994

(43)公開日 平成5年(1993)10月5日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 Q 1/02		6807-4B		
1/00	B	6807-4B		
G 01 N 27/327				
	7235-2 J	G 01 N 27/30	3 5 5	
	7235-2 J	27/46	3 0 6	

審査請求 未請求 請求項の数1(全4頁) 最終頁に続く

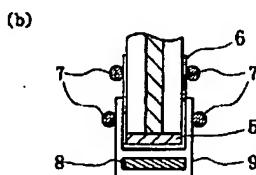
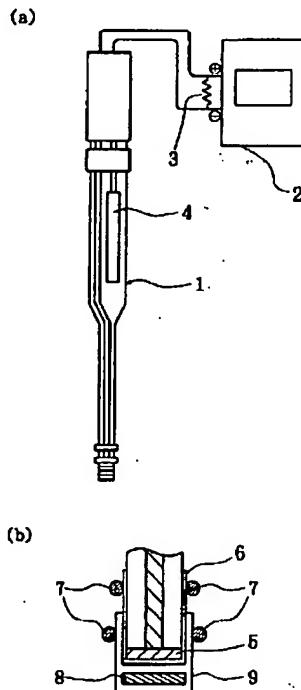
(21)出願番号	特願平4-86227	(71)出願人	000224798 同和鉱業株式会社 東京都千代田区丸の内1丁目8番2号
(22)出願日	平成4年(1992)3月10日	(71)出願人	591086706 軽部 征夫 神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地 16
		(72)発明者	沼田 雅彦 東京都千代田区丸の内1丁目8番2号 同 和鉱業株式会社内
		(72)発明者	軽部 征夫 神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16
		(74)代理人	弁理士 丸岡 政彦
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微生物センサー

(57)【要約】

【目的】 硫酸イオンを簡便な操作で低濃度まで測定することができる微生物センサーの提供。

【構成】 まず、固定化微生物としてチオバチルスフェロオキシダンスE-15株を、シルバーマン等の9K液体培地に接種し、30°Cにおいて3日間振とう培養し、この培地を低速で遠心分離した後、8000rpmで10分間遠心分離を行い菌体を集め。次に、集めた菌体をpH 2に調製した希硫酸で1回、4°Cにおいて5mMグリシン-塩酸緩衝液(pH 2.7)で2回洗浄を行った後、得られた菌体懸濁液をニトロセルロースフィルターによって吸引濾過し、菌の付着したフィルターを固定化微生物膜8とする。次いで、この固定化微生物膜8を、200メッシュのナイロン網9で包囲して、ガス透過テフロン膜6が装着された酸素電極1の先端部にOリング7で固定して微生物電極を作製し、この微生物電極に5KΩの抵抗3を並列に接続し、これを記録計2と接続する。



1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 チオバチルスフェロオキシダンスを固定化した膜と酸素電極とから構成され、塩化第一鉄を含む緩衝液中において、硫酸イオンに依存したチオバチルスフェロオキシダンスによる第一鉄イオンの酸化反応を行なせ、この反応に伴い変化する酸素量を検知することにより、該緩衝液中における硫酸イオンの濃度を測定することを特徴とする微生物センサー。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、微生物によって硫酸イオンの濃度を測定するセンサーに関するものである。詳しくは、鐵酸化細菌の酸化能力を利用して第一鉄イオンを含む溶液中の酸素濃度の変化を検知することにより、硫酸イオン濃度を測定する微生物センサーに関するものである。

【0002】

【従来の技術】 近年問題視されている酸性雨は、化石燃料の燃焼等により生ずる二酸化硫黄が大気中において酸化され、その結果生成する硫酸が主原因となっている。従来、酸性雨など液体中に含まれている硫酸イオン濃度を測定する手段としては、一般に比濁法、比色法またはイオンクロマトグラフィー法などが用いられていた。

【0003】 このうち比濁法としては、硫酸バリウムの沈殿に起因する濁度から硫酸イオン濃度を求める塩化バリウム法 (JIS K0103) などが知られており、比色法としては、アルセナゾ III法 (JIS K0103) やトリン法などが知られている。また、イオンクロマトグラフィー法とは、イオン交換樹脂を固定相とした一種の高速液体クロマトグラフィーであり、高感度 ( $> 0.05 \mu\text{M}$ ) で比較的迅速な測定を行うことができる分析法である。

【0004】 しかしながら、これら従来の分析法においては、比濁法や比色法の場合、操作が煩雑な上、自動・連続測定が困難であり、また、発色等のために危険性の高い試薬が用いられるという問題点があった。また、イオンクロマトグラフィーの場合、測定装置が高価かつ大型であるため、野外等における簡易な測定に適さないという欠点があった。

【0005】 一方、近年では、微生物や酵素を用いた簡便で特異性の高いバイオセンサーが数多く開発されており、硫酸イオン濃度測定用としては、硫酸還元菌を用いた微生物センサーなどが報告されている (R. K. Kobos (1986) Anal. Lett. 19, 353-362)。しかしながら、上記微生物センサーによると、硫酸還元菌が絶対嫌気性菌であるため、使用時に測定系の酸素を完全に除かなければならず、実用的なものではなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上述従来の技術の問題点を解決し、硫酸イオンを簡便な操作で低濃度まで測定することができる微生物センサーを提供することを目的とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、上記目的を達成するために銳意研究した結果、チオバチルスフェロオキシダンスによる第一鉄イオンの酸化反応が、硫酸イオンに依存している (N. Lazanoff, (1963) J. Bacteriol. 85, 78-83) ことに着目し、該チオバチルスフェロオキシダンスの酸化能力を利用して硫酸イオン濃度を測定することができることを見い出し、本発明に到達した。

【0008】 すなわち、本発明は、チオバチルスフェロオキシダンスを固定化した膜と酸素電極とから構成され、塩化第一鉄を含む緩衝液中において、硫酸イオンに依存したチオバチルスフェロオキシダンスによる第一鉄イオンの酸化反応を行なせ、この反応に伴い変化する酸素量を検知することにより、該緩衝液中における硫酸イオンの濃度を測定することを特徴とする微生物センサーを提供するものである。

【0009】 また、本発明の微生物センサーによる硫酸イオン濃度の測定に際しては、上記塩化第一鉄を含む緩衝液として、グリシン-塩酸または $\beta$ -アラニン-塩酸緩衝液などを用いることができる。

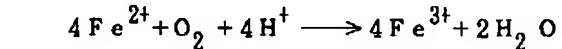
【0010】

【作用】 本発明の微生物センサーは、鐵酸化細菌の一種であるチオバチルスフェロオキシダンス（付着している鉄イオンや硫酸イオンを洗浄して取り除いたもの）を、多孔性の膜に固定化した固定化微生物膜と酸素電極とかなる微生物電極によって構成されている。

【0011】 本発明の微生物センサーに用いられているチオバチルスフェロオキシダンスは、塩化第一鉄を含む緩衝液（例えばグリシン-塩酸または $\beta$ -アラニン-塩酸緩衝液など）中において硫酸イオンが存在すると、特異的に第一鉄イオンを第二鉄イオンに酸化する作用を示す（化1）。

【0012】

【化1】



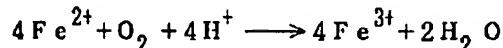
すなわち、本発明の微生物センサーは、硫酸イオンが含まれる上記緩衝液と接触させると、硫酸イオンに依存したチオバチルスフェロオキシダンスによる第一鉄イオンを第二鉄イオンに酸化する反応が進行する。この酸化反応によって酸素電極に到達する酸素量が硫酸イオン濃度に応じて適確に減少するため、該酸素量を測定（電流値として測定）することにより、硫酸イオンの濃度がわかるのである。また、本発明の微生物センサーによると、硫酸イオンは $10 \mu\text{M}$  ( $1 \mu\text{M}$ ) の濃度まで測定することが可能である。

【0013】 なお、硫酸イオンが化2に示す酸化反応において必要である理由は明確ではないが、第一鉄イオンが硫酸錯体の形でチオバチルスフェロオキシダンス細胞

表層において酸化されるためであると推測される。また、この酸化反応は、硫酸イオンの他セレン酸イオン( $\text{SeO}_4^{2-}$ )によっても進行するが、セレン酸イオン以外のほとんどの陰イオンによっては進行しないことが確認されている。

【0014】

【化2】



以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。しかし本発明の範囲は以下の実施例により制限されるものではない。

【0015】

【実施例】本発明の微生物センサーについて以下に説明する。

【0016】まず、固定化微生物としてチオバチルスフェロオキシダンスE-15株(微研第10217号)を、シルバーマン等の9K液体培地(M. P. Silverman and D. G. Lundgren (1959) J. Bacteriol. 77, 642-647)に接種し、30°Cにおいて3日間振とう培養した。次いで、この培地を低速(1000rpm、5分)で遠心分離してジャロサイトを主体とする無機塩の沈殿を除いた後、8000rpmで10分間遠心分離を行い菌体を集めめた。

【0017】次に、集めた菌体をpH2に調製した希硫酸により1回洗浄した後、4°Cにおいて5mMグリシン-塩酸緩衝液(pH 2.7)で2回洗浄(懸濁および遠心)を行った。次いで、洗浄後得られた菌体懸濁液をニトロセルロースフィルター(ADVANTEC TOYO社 Membrane Filter、細孔径0.45μm)によって吸引濾過し、菌の付着したフィルターを固定化微生物膜とした。なお、該固定化微生物膜における菌の密度はおよそ $2 \times 10^7 / \text{mm}^2$ である。

【0018】また、上記シルバーマン等の9K培地は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{KCl}$  0.1g、および $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.01gを蒸留水に溶かしてその総量を700mlとし、これを硫酸によってpHを5.5に調製した無機塩溶液、および $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  44.22gを蒸留水に溶かしてその総量を300mlとした第一鉄溶液を、オートクレーブによって別々に滅菌し(120°C、10分間)、冷却した後両溶液を混合して調製した。

【0019】上記のようにして得た固定化微生物膜8は、200メッシュのナイロン網9で包囲して酸素電極1の先端部にOリング7で固定し、微生物電極を作製した。なお、酸素電極1は鉛陰極4および白金陽極5をしてなるガルバニ式(DG-5型、エイブル社製)のものを使用した。また、酸素電極1において固定化微生物膜8が装着される先端部には、あらかじめOリング7によってガス透過テフロン膜6を固定しておいた。

【0020】次に、作製した微生物電極に5KΩの抵抗

3を並列に接続し、これを記録計2と接続して微生物センサーを作製した(図1)。このような構成とすることにより、白金陽極5の表面における酸素濃度に比例して発生する電流は、抵抗3によって電位変化となり、この電位変化が記録計2によって記録される。

【0021】上記のような構成の微生物センサーを用い、硫酸イオンの測定を行った。測定は5mM塩化第一鉄を含む5mMグリシン-塩酸緩衝液(pH 2.7)中に微生物電極の先端部を浸漬して行った。なお、上記緩衝液としては、5mMβアラニン-塩酸緩衝液(pH 3.5)なども用いることができる。

【0022】まず、上記緩衝液を30°Cにおいて充分に攪拌し、空気中の酸素と溶解平衡に達した時点で硫酸ナトリウムを添加し、減少する電流値が一定となったところで(5~10分)測定を終了した。その結果、10~150μMの硫酸イオン濃度の測定が可能であった(図2)。なお、上記緩衝液を硫酸イオンが含まれていないものと交換すれば、5~15分で電流値はほぼもとの値に復帰する。

【0023】本発明の微生物センサーによると、例えば酸性雨中には塩化物イオンや硝酸イオンが、モル濃度に対して1~5倍程度存在しているが、測定液中にそれぞれのイオンが硫酸イオンに対してモル濃度で50倍(塩化物イオン)、10倍(硝酸イオン)まで存在していても測定には問題がなかった。また、硫酸イオンの対イオンがナトリウムイオンではなく、水素イオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、アルミニウムイオン、亜鉛イオン、鉄イオンまたは銅イオン等の場合であっても、ほぼ上記同様の結果が得られた。

【0024】

【発明の効果】上述のように本発明の微生物センサーの開発により、10μM(1ppm)以上の濃度の硫酸イオンを、安価な電極によって非常に簡単に測定することが可能となった。また、使用する試薬が安全性に問題のない緩衝液と鉄塩のみであるという利点をも有している。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の微生物センサーの概念図であって、(a)は全体図、(b)は(a)の酸素電極先端部を拡大した側面図である。

【図2】本発明の微生物センサーを用いて硫酸イオン濃度の測定を行った際における電流減少値と、硫酸ナトリウム濃度との関係を示すグラフである。

【符号の説明】

- 1……酸素電極
- 2……記録計
- 3……抵抗
- 4……鉛陰極
- 5……白金陽極
- 6……ガス透過テフロン膜
- 7……Oリング

(4)

特開平5-252994

5

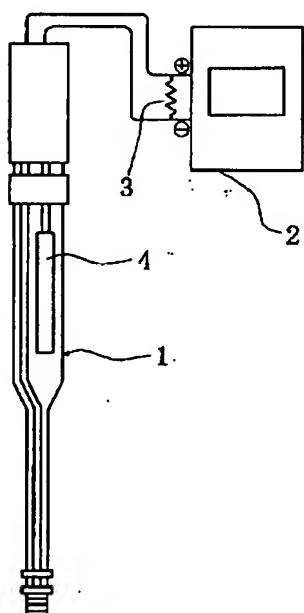
6

8……固定化微生物膜

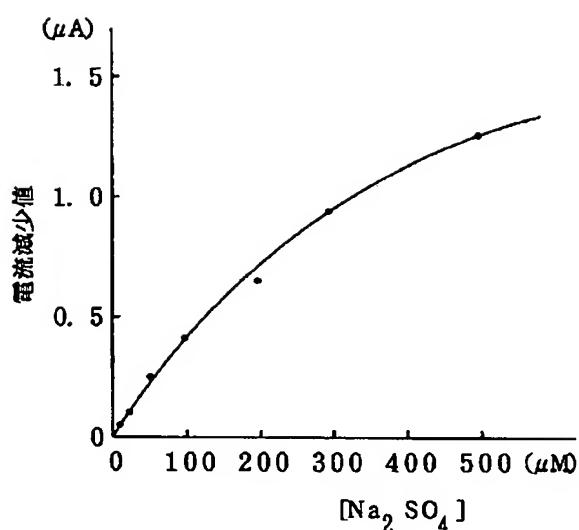
9……ナイロン網

【図1】

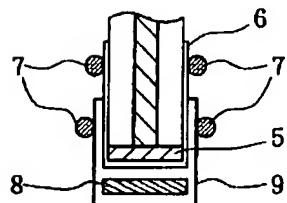
(a)



【図2】



(b)



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

G 01 N 27/49

(72) 発明者 蟻川 芳子

東京都日野市日野台1-19-1・208

## **PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11) Publication number : **05-252994**  
(43) Date of publication of application : **05.10.1993**

---

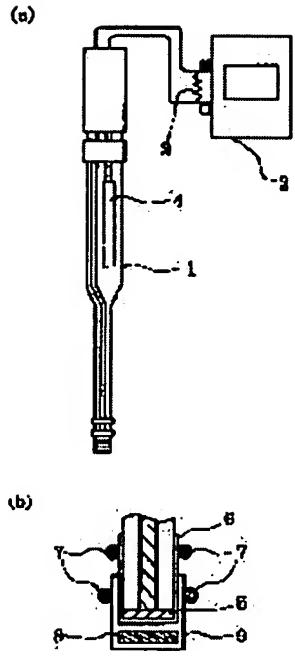
(51) Int.Cl.                   **C12Q 1/02**  
                                 **C12Q 1/00**  
                                 **G01N 27/327**  
                                 **G01N 27/49**

---

(21) Application number : **04-086227** (71) Applicant : **DOWA  
MINING CO  
LTD  
KARUBE  
MASAO**  
(22) Date of filing : **10.03.1992** (72) Inventor : **NUMATA  
MASAHIKO  
KARUBE  
MASAO  
ARIKAWA  
YOSHIKO**

---

(54) **MICROORGANISM SENSOR**



(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a microorganism sensor capable of measuring sulfate ion till a low concentration by a simple operation.

CONSTITUTION: First, Thiobacillus ferrooxidans E-15 strain as an immobilized bacterium is inoculated to 9K liquid medium such as Silverman's liquid medium, subjected to shaking culture at 30°C for three days, the medium is centrifuged at low speed and centrifuged at 8,000rpm for 10 minutes to collect cells. Then the collected cells are once washed with diluted sulfuric acid adjusted to pH 2, then twice with 5mM glycine-hydrochloric acid

buffer solution (pH 2.7) at 4°C and the prepared suspension of the cells is filtered with a nitrocellulose filter by suction and the filter to which the cells are stuck is used as an immobilized bacterium film 8. Then, the immobilized bacterium film 8 is enclosed with a nylon net 9 having 200 meshes and fixed to the top of an oxygen electrode 1 equipped with a gas passable Teflon membrane 6 with an O ring 7 to prepare a bacterial electrode. A resistance (3) of 5KΩ is connected to the bacterial electrode in parallel and the resistance is connected to a recorder 2.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 29.01.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3119312

[Date of registration] 13.10.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

---

## CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The microbial sensor characterized by measuring the concentration of the sulfate ion in this buffer solution by consisting of the film and oxygen electrodes which fixed Thiobacillus ferro oxydans, advancing oxidation reaction of the first iron ion by the Thiobacillus ferro oxydans which was dependent on sulfate ion into the buffer solution containing ferrous chloride, and detecting the amount of oxygen which changes with this reaction.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the microbial sensor which measures sulfate ion concentration by detecting change of the oxygen density in the solution which contains the first iron ion in more detail about the sensor which measures the concentration of sulfate ion using the oxidation capacity of an iron bacterium by the microorganism.

[0002]

[Description of the Prior Art] The sulfuric acid which the

sulfur dioxide which produces the acid rain regarded as questionable in recent years by combustion of a fossil fuel etc. oxidizes in atmospheric air, and generates as a result is the cause of main. Conventionally, generally as a means to measure the sulfate ion concentration contained in liquids, such as acid rain, nephelometry, the colorimetric method, or the ion chromatography method was used.

[0003] among these, the barium chloride method (JIS K0103) for asking for sulfate ion concentration from the turbidity resulting from precipitate of a barium sulfate as nephelometry etc. gets to know -- having -- \*\*\*\* -- as a colorimetric method -- arsenazo III -- law (JIS K0103), the thorin method, etc. are learned. Moreover, the ion chromatography method is a kind of high performance chromatography which made ion exchange resin the stationary phase, and is an analysis method which can perform comparatively quick measurement by high sensitivity (> 0.05 ppm).

[0004] However, in the case of nephelometry or a colorimetric method, in the analysis method of these former, there was a trouble that automatic and continuous measurement were difficult the top where actuation is complicated, and the high reagent of danger was used for coloring etc. Moreover, in the case of the ion chromatography method, since the measuring device was expensive and large-sized, there was a fault of not being suitable for the simple measurement in the outdoors etc.

[0005] On the other hand, by recent years, it is simple, many biosensors with high singularity are developed, and the microbial sensor for which the microorganism and the enzyme were used using the sulfate-reducing bacterium as an object for sulfate ion density measurement is reported (R.K.Kobos (1986) Anal.Lett.19 and 353-362). However, according to the above-mentioned microbial sensor, since a sulfate-reducing bacterium was a strictly anaerobic bacterium, the oxygen of system of measurement had to be completely removed at the time of use, and it was not practical.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention solves the trouble of the above-mentioned Prior art, and aims at offering the microbial sensor which can measure sulfate ion to low concentration by simple actuation.

[0007]

[Means for Solving the Problem] In order to attain the above-mentioned purpose, as a result of inquiring wholeheartedly, this invention person etc. found out that oxidation reaction of the first iron ion by Thiobacillus ferro oxydans could measure sulfate ion concentration using the oxidation capacity of this Thiobacillus ferro oxydans paying attention to what it depends for on sulfate ion (N.Lazanoff (1963), J.Bacteriol.85, 78-83), and reached this invention.

[0008] That is, this invention offer the microbial sensor characterize by measuring the concentration of the sulfate ion in this buffer solution by consisting of the film and oxygen electrodes which fixed Thiobacillus ferro oxydans, advancing oxidation reaction of the first iron ion by the Thiobacillus ferro oxydans which be dependent on sulfate ion into the buffer solution containing ferrous chloride, and detecting the amount of oxygen which change with this reaction.

[0009] Moreover, on the occasion of measurement of the sulfate ion concentration by the microbial sensor of this invention, a glycine-hydrochloric acid or the beta alanine-hydrochloric-acid buffer solution can be used as the buffer solution containing the above-mentioned ferrous chloride.

[0010]

[Function] The microbial sensor of this invention is constituted by the microbial electrode which consists of immobilized microorganism film which fixed the Thiobacillus ferro oxydans (what washed and removed adhering iron ion and sulfate ion) which is a kind of an iron bacterium on the porous film, and an oxygen electrode.

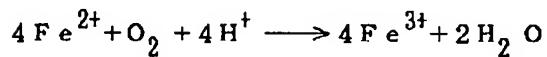
[0011] The Thiobacillus ferro oxydans used for the microbial sensor of this invention shows the operation which oxidizes the

first iron ion to a ferric ion specifically, when sulfate ion exists in the buffer solutions (for example, a glycine-hydrochloric acid or the beta alanine-hydrochloric-acid buffer solution etc.) containing ferrous chloride (\*\* 1).

[0012]

[Formula

1]



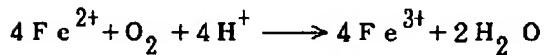
That is, if the microbial sensor of this invention is contacted to the above-mentioned buffer solution with which sulfate ion is contained, the reaction which oxidizes the first iron ion by the Thiobacillus ferro oxydans depending on sulfate ion to a ferric ion will advance. In order that the amount of oxygen which reaches an oxygen electrode may decrease accurately according to sulfate ion concentration by this oxidation reaction, by measuring this amount of oxygen (it considering as a current value and measuring) shows the concentration of sulfate ion. Moreover, according to the microbial sensor of this invention, sulfate ion can be measured to the concentration of 10 microM (1 ppm).

[0013] In addition, although the reason for being required is not clear in sulfate ion in the oxidation reaction shown in \*\* 2, it is surmised that it is for the first iron ion to oxidize in a Thiobacillus ferro oxydans cell cortex in the form of a sulfuric-acid complex. Moreover, although this oxidation reaction advances also with the other selenic-acids ion ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) of sulfate ion, not going on depending on almost all anions other than selenic-acid ion is checked.

[0014]

[Formula

2]



Hereafter, an example explains this invention to a detail further. However, the range of this invention is not restricted

by the following examples.

[0015]

[Example] The microbial sensor of this invention is explained below.

[0016] First, as an immobilized microorganism, E-15 shares (Fermentation Research Institute \*\*\*\* No. 10217) of *Thiobacillus ferro oxydans* was inoculated into 9K liquid media (M.P.Silverman and D.G.Lundgren (1959) J.Bacteriol.77, 642-647), such as Silverman, and carried out shaking culture for three days in 30 degrees C. Subsequently, at-long-intervals alignment separation was performed for 10 minutes by 8000rpm after removing precipitate of the mineral salt which carries out centrifugal separation of this culture medium at a low speed (1000rpm, 5 minutes), and makes a jarosite a subject, and fungus bodies were collected.

[0017] Next, after the dilute sulfuric acid which prepared the collected fungus bodies to pH 2 washed once, in 4 degrees C, the 5mM glycine-hydrochloric-acid buffer solution (pH 2.7) performed washing (suspension and centrifugal) twice. Subsequently, suction filtration of the fungus body suspension obtained after washing was carried out by the nitrocellulose filter (ADVANTEC TOYO shrine Membrane Filter, pole diameter of 0.45 micrometers), and the filter to which the bacillus adhered was used as the immobilized microorganism film. in addition, the consistency of the bacillus in this immobilized microorganism film -- about  $2 \times 10^7$  / mm<sup>2</sup> it is .

[0018] 9K culture media, such as above-mentioned Silverman, moreover, 2 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub> and 7H<sub>2</sub>O 0.5g, KCl 0.1g and calcium(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.01g are melted to distilled water, and it is the total amount. It is referred to as 700ml. The mineral salt solution which prepared pH for this to 5.5 with the sulfuric acid, and FeSO<sub>4</sub> and 7H<sub>2</sub>O 44.22g are melted to distilled water, and it is the total amount. The first iron solution set to 300ml Both solutions were mixed and prepared, after sterilizing separately (for 120 degree C and 10 minutes) and cooling with an autoclave.

[0019] It surrounded with the immobilized microorganism film 8 obtained as mentioned above and the nylon network 9 of 200 meshes, and fixed to the point of an oxygen electrode 1 with O ring 7, and the microbial electrode was produced. In addition, the oxygen electrode 1 used the thing of the GARUBANI type (DG-5 mold, Able, Inc. make) which comes to have the lead cathode 4 and the platinum anode plate 5. Moreover, gas transparency Teflon membrane 6 was beforehand fixed to the point equipped with the immobilized microorganism film 8 in an oxygen electrode 1 with O ring 7.

[0020] Next, the resistance 3 of 5Kohm was connected to the produced microbial electrode at juxtaposition, this was connected with the recorder 2, and the microbial sensor was produced (drawing 1). By considering as such a configuration, the current generated in proportion to the oxygen density in the front face of the platinum anode plate 5 serves as potential change by resistance 3, and this potential change is recorded by the recorder 2.

[0021] Sulfate ion was measured using the microbial sensor of the above configurations. Into the 5mM glycine-hydrochloric-acid buffer solution (pH 2.7) containing 5mM ferrous chloride, measurement was immersed and performed the point of a microbial electrode. In addition, as the above-mentioned buffer solution, the 5mM beta alanine-hydrochloric-acid buffer solution (pH 3.5) etc. can be used.

[0022] First, the above-mentioned buffer solution was fully stirred in 30 degrees C, and measurement (5 - 10 minutes) was ended in the place where the sodium sulfate was added at when the oxygen in air and a dissolution balance were reached, and the current value which decreases became fixed. Consequently, measurement of the sulfate ion concentration of 10 - 150microM was possible (drawing 2). In addition, if the above-mentioned buffer solution is exchanged for that in which sulfate ion is not contained, a current value will return to the value of a basis mostly in 5 - 15 minutes.

[0023] According to the microbial sensor of this invention, although chloride ion and about 1-5-time nitrate ion existed to mol concentration, for example in acid rain, even if each ion existed up to 50 times (chloride ion) and 10 times (nitrate ion) with mol concentration to sulfate ion in measurement liquid, there was no problem in measurement. Moreover, even if the counter ions of sulfate ion were cases, such as not sodium ion but a hydrogen ion, potassium ion, magnesium ion, aluminum ion, zinc ion, iron ion, or a copper ion, the almost same result as the above was obtained.

[0024]

[Effect of the Invention] Development of the microbial sensor of this invention enabled it to measure the sulfate ion of the concentration more than 10microM (1 ppm) very simple with a cheap electrode as mentioned above. Moreover, it also has the advantage that the reagent to be used is only the buffer solution and iron salt which do not have a problem in safety.

---

#### DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the conceptual diagram of the microbial sensor of this invention, and is the sectional side elevation to which (a) expanded general drawing and (b) expanded the oxygen electrode point of (a).

[Drawing 2] It is the graph which shows the relation between the current deduction at the time of measuring sulfate ion concentration using the microbial sensor of this invention, and sodium-sulfate concentration.

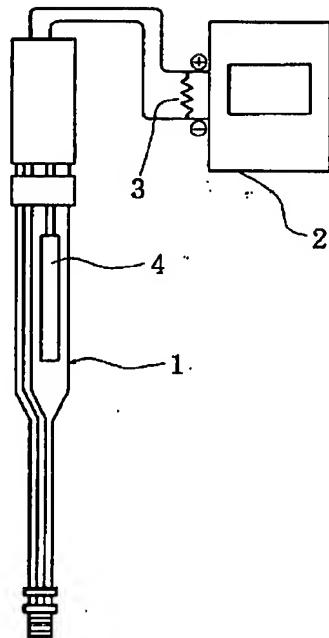
[Description of Notations]

1	.....	Oxygen	electrode
2	.....		Recorder
3	.....		Resistance
4	.....	Lead	cathode
5	.....	Platinum	anode plate

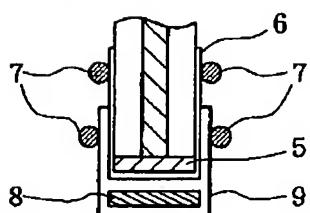
6 ..... Gas transparency Teflon membrane  
7 ..... O ring  
8 ..... Immobilized microorganism film  
9 ..... Nylon network

Drawing 1

(a)



(b)



Drawing 2

